

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
19. Juni 2003 (19.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/050535 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/50,**  
C12Q 1/02

114, 22525 Hamburg (DE). **EVOTEC TECHNOLOGIES GMBH** [DE/DE]; Max-Planck-Str. 15a, 40699 Erkrath (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13996

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:  
10. Dezember 2002 (10.12.2002)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HENCO, Karsten** [DE/DE]; Tiefenberg 27, 40629 Düsseldorf (DE). **JESSEN, Timm** [DE/DE]; Bäckerweg 1, 24357 Fleckeby (DE). **KUPPER, Jürgen** [DE/DE]; Burbekstr. 47, 22523 Hamburg (DE). **GREINER, Erich** [DE/DE]; Brückenstr. 34, 69120 Heidelberg (DE). **GÜNTHER, Rolf** [DE/DE]; Simon-von-Utrecht-Str. 65, 20359 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 60 413.0 10. Dezember 2001 (10.12.2001) DE

(74) Anwälte: **MEYERS, Hans-Wilhelm** usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

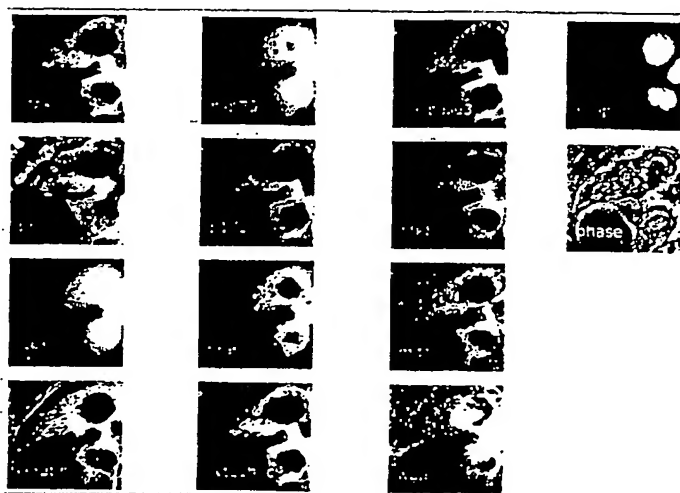
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVOTEC OAI AG** [DE/DE]; Schnackenburgallee

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE INFLUENCE OF NON-PHYSIOLOGICAL COMPOUNDS THE DERIVATIVES AND DECOMPOSITION PRODUCTS THEREOF ON ORGANISMS ORGANS AND CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON EINFLÜSSEN UNPHYSIOLOGISCHER VERBINDUNGEN, DEREN DERIVATE UND ABBAUPRODUKTE AUF ORGANISMEN, ORGANE UND ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining reversible or irreversible physiological side-effects of a substance whereby said method comprises the following steps: a) preparation of a sample treated with the substance, preferably comprising a single cell or several cells in a cell structure or an organ, b) determination of cellular and/or sub-cellular patterns from regional localisations and co-localisations of at least two different molecules, in particular proteins, RNA molecules, or DNA segments, in at least one sub-population of cells, c) comparison of the pattern obtained in step b) with patterns from an untreated control sample and d) determination of a physiological side-effect of the substance by means of various patterns for a treated sample in comparison with an untreated sample.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/050535 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SE, SI, SK, TR). OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren zur Bestimmung von reversiblen oder irreversiblen physiologischen Nebenwirkungen einer Substanz, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt: a) Bereitstellen einer mit der Substanz behandelten Probe, vorzugsweise bestehend aus einer Zelle oder mehreren Zellen in einem Zellverband oder einem Organ, b) Bestimmen zellulärer und/oder subzellulärer Muster aus örtlicher Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, insbesondere Proteine, RNA-Moleküle oder DNA-Segmente, in mindestens einer Subpopulation von Zellen, c) Vergleichen der im Schritt b) erhaltenen Muster mit Mustern einer unbehandelten Kontrollprobe, d) Ermitteln einer physiologischen Nebenwirkung der Substanz anhand unterschiedlicher Muster für eine behandelte Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.

## **Verfahren zur Bestimmung von Einflüssen unphysiologischer Verbindungen, deren Derivate und Abbauprodukte auf Organismen, Organe und Zellen**

### **Zusammenfassung:**

Beschrieben wird ein Verfahren zur Bestimmung induzierter Effekte unphysiologischer Substanzen, deren Derivate oder Abbauprodukte, auf vorzugsweise nicht bekannte Wechselwirkungspartner in Form von Molekülen, Molekülkomplexen oder von subzellulären Strukturen einer Zelle, eines Zellverbandes, eines Organs oder Organismus zur Detektion der Beeinflussung eines physiologischen Zustandes einer Zelle, eines Zellverbandes, eines Organs oder Organismus, indem subzelluläre Muster bestimmt werden, die auf der Lokalisation von Molekülen und der räumlichen Korrelation von mindestens zwei Molekülen, die als Co-Lokalisation bezeichnet wird und auf der Molekülkonzentration basieren. Erfindungsgemäß relevant sind spezifisch die nicht-Target-bezogenen Wechselwirkungen im Vergleich zu Effekten, die sich durch Wechselwirkungen mit dem pharmakologisch anzugreifenden Targetmolekül, bezeichnet als Target, ergeben.

Unphysiologische Verbindungen in Form von Pharmaka, Nahrungsmittelzusätzen, Giftstoffe, technisch verwendete Substanzen, Pflanzenschutzmittel, Insektizide, Pestizide, Kosmetika, Waschmittel-ingredienten etc. müssen in ihren Wirkungen auf biologische Systeme analysiert werden. Wir bezeichnen diese Verbindungen im folgenden als Substanzen oder als Compounds. Es gilt, ihre Unbedenklichkeit für mögliche Exposition biologischer Systeme wie Mensch, Tier, Pflanze oder die mikrobielle Umwelt festzustellen. Dies gilt sowohl für die Substanzen selbst als auch für deren mögliche Abbauprodukte, Metabolite oder Derivate.

Viele dieser Substanzen werden dafür entwickelt, daß sie gezielt mit spezifischen Zielmolekülen, sogenannten Targets, in eine beabsichtigte Wechselwirkung treten, um beispielsweise eine pharmakologische oder

technische Wechselwirkung zu entfalten. Für die Analyse dieser beabsichtigten Wechselwirkungen werden spezifische Tests; sogenannte Assays, eingesetzt, die diese gewünschten Wechselwirkungen, wie beispielsweise die Inhibition eines Enzyms, die Blockade oder Aktivierung eines Rezeptors, etc. anzeigen. Idealerweise zeigen solche Verbindungen unter den verwendeten Konzentrationsbedingungen keine hochaffinen Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen eines Organismus oder einer Zelle, so daß sogenannte unspezifische Wirkungen nicht auftreten.

Keinerlei Nebenwirkungen hervorzurufen, ist allerdings ein Idealfall, der in der Praxis untypisch ist. Vielmehr haben Substanzen mit Affinität zu einem biologischen Molekül auch mehr oder weniger ausgeprägte Affinitäten zu anderen biologischen Molekülen, insbesondere zu denen, die mit dem eigentlichen Targetmolekül strukturell oder in ihrer Oberflächenstruktur verwandt sind. In der Pharmaforschung werden daher typischerweise Familien von strukturell mit dem Target verwandten Molekülen herangezogen, um eine sogenannte Selektivitätsprüfung durchzuführen. Dies ist insbesondere deshalb wichtig, da auch strukturell verwandte Moleküle gemeinsamen evolutiven Ursprungs sehr unterschiedliche funktionale Aufgaben innerhalb eines Organismus haben können. Als Resultat können unerwünschte Wirkungen auf den Gesamtorganismus resultieren. Derartige spezifische Assays sind typischerweise noch mit hinreichendem Aufwand zu konstruieren z.B. für die Familie der 7-Transmembran-Rezeptoren oder jeweils gegen Phosphatasen, Proteasen, Kinasen etc., da dem Assay ein gemeinsam nutzbares Bauprinzip zugrundeliegt.

Trotz all dieser Verfahren, die bereits heute in hoher Stückzahl bei frühen Prozessschritten z.B. der Pharmawirkstoffentwicklung eingesetzt werden können, sind komplexe Tiermodelle notwendig geblieben, um Langzeit-Effekte der Toxizität und sonstigen Effekte im Sinne von Nebenwirkungen auf die Physiologie eines Organismus zu studieren. Häufig verlangen die Zulassungsbehörden wie die FDA eine Exposition eines Gesamtorganismus im Sinne von Testpflanzen oder Tierexperimenten, um am Ende Einflüsse von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte auf

Moleküle des Organismus zu studieren, indem makroskopisch meßbare Parameter herangezogen werden, z.B. die Lethalität bei verschiedenen angewandten Konzentrationen (LD 50), die Mutagenizität, die Teratogenizität, Wachstums hemmung, Fertilität etc.. Dazu gehören auch Langzeit-Ratten-Tests von 1 Jahr und länger, um auch scheinbar nicht-toxische, geringe Dosen von Substanzen in ihrer Langzeitauswirkung zu messen. Diese Wirkungen sind nicht mit leicht detektierbarer, akuter Toxizität verbunden oder unmittelbar lethal, aber sie führen zu Langzeitschädigungen des Gesamtorganismus mit beträchtlichen Wirkungen. Solche Experimente sind langwierig, kostspielig, ethisch problematisch, und mit ihren Resultaten nicht immer von molekular interpretierbarer Aussagekraft. Außerdem fallen derartige Ergebnisse häufig zu einem Zeitpunkt an, bei dem die Entwicklung einer neuen chemischen Substanz für einen bestimmten Verwendungszweck bereits hohe Investitionen beansprucht hat. Viele dieser nicht-Target-bezogenen Nebenwirkungen haben kurzfristig oder langfristig irreversiblen Charakter wie Induktion von Apoptose, Nekrose oder den Übergang in den Status ungehemmter Zellproliferation. Viele Nebenwirkungen haben aber durchaus reversiblen Charakter, wenn eine Medikation beendet oder ausgesetzt wird. Insbesondere solch reversible Änderungen sind mit herkömmlichen Testsystemen schwer oder gar nicht zu erfassen.

Gerade in jüngster Zeit erregte der Fall eines Cholesterinsenkers Aufmerksamkeit. Hier führen offensichtlich erhöhte Dosen des als sicher eingestuften Arzneimittels in Kombination mit einer gleichzeitig applizierten weiteren Wirksubstanz zu letztendlich dramatischen Wirkungen auf das Muskelgewebe mit möglicher Todesfolge. Es bedarf eines Verfahrens, das es erlaubt, im Vorfeld sensitiv, zuverlässig und mit hoher Informationsdichte Einflüsse von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivaten oder Abbauprodukten, einzeln oder in Verbindung mit anderen Substanzen auf Zellen, Gewebe und Organismen nachzuweisen.

Ein weiteres Problemfeld ist in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, nämlich die genetische Disposition bezogen auf die Wirksamkeit eines Medikamentes auf den individuellen

Organismus. Die sogenannte genetische Disposition des Individuums kann die Inzidenz und Progredienz bestimmter Erkrankungen beeinflussen (z.B. die Neigung zum Herzinfarkt oder zu bestimmten Tumoren (Darmkrebs)), die Ansprechbarkeit auf bestimmte Medikamente (z.B. Herceptin bei Brustkrebs oder die Gewebeabstoßung bei Implantaten) aber auch die begleitenden irreversiblen und reversiblen Nebenwirkungen von Medikamenten, die nicht Target-bezogen sind und in den hier behandelten Bereich der ADMET-Analysen (Administration = Art der Verabreichung/Formulierung, Distribution = Verteilung im Organismus, Metabolism = Metabolismus der Verbindung im Organismus (Leber etc.), Excretion = Ausscheidungscharakteristik und Toxicology = unerwünschte toxische Nebenwirkungen) fallen.

Für den Patienten, den behandelnden Arzt, die forschende Pharmaindustrie und auch das private oder staatliche Gesundheits- und Versicherungswesen ist es außerordentlich wichtig, die individuelle genetische Konstellation bezüglich dieser Effekte zu kennen. Das bedeutet frühe und sichere Einschätzung der Wirksamkeit einer Therapie bei unterschiedlichen Genotypen und Populationen. Dazu gehört auch im Vorfeld der Forschung und Entwicklung das Wissen um die gesicherte molekulare Wirksamkeit bei unterschiedlich genotypisierten Modellsystemen mit der Konsequenz geringer Mißerfolgsraten in der Behandlung. Was für die Target-spezifische Wirkung gilt, gilt aber eben auch für den hier relevanten, nicht-Target-bezogenen Bereich der ADMET-Wirkungen.

Die sogenannte SNP-Analytik (single nucleotide polymorphism analysis) hat sich in den letzten Jahren als analytisches Hilfsmittel etabliert. Hierbei wird ausgenutzt, daß ein spezifischer Genotyp, der für Wirksamkeitsprofile oder Nebenwirkungsprofile verantwortlich ist, mit einem spezifischen Mutantenmuster auf Genomebene eines Patienten korreliert. Häufig sind es gar nicht diese Mutationen selbst, die kausal mit den zu messenden Effekten korreliert sind. Es hat sich nur gezeigt, daß bestimmte SNPs mit eben diesen Effekten eng korreliert sind, das heißt, sie co-segregieren bei der Vererbung mit dem interessierenden funktionalen Effekt. Die PCR-Methode macht es möglich, derartige SNP-Muster z.B. auf der Basis von Chips individuell zu

registrieren. Ein großer Vorteil wäre es natürlich, wenn mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand anstelle nicht direkt korrelierter SNP-Marker, die Target-bezogenen sowie die nicht-Target-bezogenen Effekte einer irreversiblen aber auch reversiblen Wirkung einer oder mehrerer Substanzen selbst auf den individuellen Organismus oder das genetisch individuelle Zellsystem gemessen werden könnten. Die Bedeutung ist um so größer, wenn keine bekannten SNPs als aussagefähige Marker zur Verfügung stehen.

In jüngerer Zeit gibt es vermehrt Bestrebungen, wie bei der beschriebenen SNP-Analytik auch Tierversuche statt im Tier mit Hilfe von in vitro-Systemen zu simulieren und in bestimmten Assay-Formaten durchzuführen. Sie werden häufig als eADMET-Assays (frühe ADMET-Assays) bezeichnet, und basieren auf molekularen oder zellulären Testsystemen mit hoher Durchsatzkapazität bei vertretbarem Kostenaufwand.

Seit langer Zeit werden bereits Mutagenitätstests (Ames Tests), das heißt der Einfluß unphysiologischer Substanzen auf die Replikation und Fehlerkorrektur der Genom-Replikation analysiert. Mutagene Substanzen werden z.B. makroskopisch über Farbänderungen von mikrobiellen Zellkolonien registriert. Toxische Effekte werden neuerdings über die Veränderung von spezifischen Proteinkonzentrationen oder Enzymaktivitäten in Gewebehomogenaten oder auch in Einzelzellen von Geweben gemessen. mRNA-Konzentrationsmuster aus Gewebeproben bzw. Zellkulturen dienen der Analyse der Wirkungen von unphysiologischen Substanzen auf der Ebene der Transkription oder der post-transkriptionalen mRNA Modifikation. Es werden insbesondere die Wirkungen von unphysiologischen Substanzen, deren Derivate und Abbauprodukte auf die Enzyme des Entgiftungssystems der Leber analysiert (z.B. P450 Isoenzyme). Ein gemeinsames Merkmal all dieser genannten Verfahren ist es, dass die Analysen eine minimale Probenmenge beanspruchen, die mindestens 10.000 bis 100.000 Einzelzellen umfaßt. Dies ist nur bei der Analyse homogener Zellkulturen ohne grundsätzlichen Nachteil. Gewebeproben beinhalten jedoch grundsätzlich unterschiedlichste Zelltypen oder Zellen unterschiedlichen Differenzierungs- oder Reifungszustand, die auf Einflüsse unphysiologischer Substanzen ganz unterschiedlich reagieren

können. Die Methoden sind aber für die Einzelzellanalyse nicht sensitiv genug.

Es ist bislang nicht möglich, experimentell alle möglichen Wechselwirkungen von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivaten oder Abbauprodukten mit allen möglichen Proteinen zu messen, schon gar nicht, wenn man sie nicht anhand einer veränderten Funktion dieser Proteine messen kann. Es sind aber die Proteine und ihre modifizierten bzw. prozessierten Varianten, die auf molekularer Ebene für den funktionalen Status einer Zelle in einer übergeordneten Gewebestruktur verantwortlich sind. Die Erfindung bezieht sich auf die überraschende Erkenntnis, daß sich ADMET-Eigenschaften von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte sich nicht nur in veränderten meßbaren Funktionen von Proteinen wie Enzymaktivitäten oder Konzentrationen der Proteine oder der sie kodierenden Gen-Transkripte spiegeln. Vielmehr stellt die Musterbildung von verschiedenen Proteinen in Form ihrer Lokalisation und der räumlichen Korrelation mit anderen Proteinen, die wir als Co-Lokalisation bezeichnen oder ihrer Konzentration einen zuverlässigen, sensiblen Frühindikator für spätere auffällige reversible oder irreversible Effekte dar. Dazu gehören beispielsweise unter anderem AH-Antwort, Akuter Phasenstress, Antimetabolismus, anti-Apoptose und Apoptose, Antiproliferation, Aufbrauch der ATP Reserven, Autoimmunreaktionen, Cholestase, De-/Differenzierung, DNA Schaden, DNA Replikation, Entzündung, Entzündungsreaktionen, Fettleber, Fibrose, Freisetzung von Arachidonsäure, frühe Genantworten, genereller Zellstress, Glucoseentzug, Hitzeschock, Hypercholesterolemie, Hypoxie, Hypersensitivität, Immunotoxizität, Invasion, Ionentransport, Lebertoxizität, Leberregeneration, Mitochondrienfunktion, Mitoseinduktion, Multidrugresistenz, Nierentoxizität, Östrogenizität, oxidativer Stress, Peroxisomenproliferation, Peroxisomenschaden, Rekombination, Ribotoxizität oder ribotoxischer Stress, Sclerose, Steatosis, Stress des endoplasmatischen Reticulums, Teratogenese, Transformation, Unterbrechung der Translation, Transport, Tumorsuppression, Unterbrechung des Zellzyklus, Wachstumsstopp, Zerstörung der zellulären Matrix, Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation, Zellregeneration, Zell-Zell Kommunikation.



Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Bestimmung von nicht-Target-bezogenen Wechselwirkungen und durch nicht-Target-bezogene Wechselwirkungen induzierter Effekte, wenn chemische oder biologische Substanzen, deren Derivate oder Abbauprodukte in ihren Wirkungen auf Zellen, einer Kollektion von Einzelzellen eines Zelltyps, von Zellen eines Zellverbandes oder Gewebes, von Zellen eines Organs oder eines Organismus getestet werden, um reversible oder irreversible toxische Nebenwirkungen oder neue Wirkmechanismen zu studieren. Das hier beschriebene Verfahren wird bevorzugt *ex corpore*, d.h. außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers angewandt. Es werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt aus dem Körper isolierte Zellen, Gewebe und Organe, sowie Zellen in der Zellkultur als Proben und Untersuchungsobjekte benutzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von reversiblen oder irreversiblen physiologischen Nebenwirkungen einer Substanz umfaßt die folgenden Schritte: (a) Bereitstellen einer mit der Substanz behandelten Probe, vorzugsweise bestehend aus einer Zelle oder mehreren Zellen in einem Zellverband oder einem Organ, (b) Bestimmen zellulärer und/oder subzellulärer Muster aus örtlicher Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, insbesondere Proteine, RNA-Moleküle oder DNA-Segmente, in mindestens einer Subpopulation von Zellen, (c) Vergleichen der im Schritt (b) erhaltenen Muster mit Mustern einer unbehandelten Kontrollprobe, und (d) Ermitteln einer physiologischen Nebenwirkung der Substanz anhand unterschiedlicher Muster für eine behandelte Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.

Definition von "nicht-Target-bezogenen Wechselwirkungen": Die primären Zielstrukturen von Wirksubstanzen heißen Targets. Es sind diejenigen Moleküle, die über spezifische Grenzflächen wie aktive Zentren über molekulare Interaktionen mit der Wirksubstanz physikalisch interagieren. So werden beispielsweise Enzyme reversibel oder irreversibel gehemmt, Rezeptoren agonistisch aktiviert oder antagonistisch geblockt oder

Ionenkanäle in ihrer elektrophysiologischen Charakteristik verändert. Diese Interaktionen von Wirksubstanzen oder ihrer Metaboliten und ihre Target-vermittelten Folgeeffekte werden als Target-bezogene Wechselwirkungen verstanden und sind nicht Gegenstand dieser Erfindung. Anderweitige Wechselwirkungen und ihre molekularen Folgeerscheinungen mit Molekülen, Molekülkomplexen, Zellen, oder Organen eines Organismus, die nicht auf die Wechselwirkung mit dem pharmakologischen Target zurückzuführen sind, werden im folgenden als nicht-Target-bezogene Wechselwirkungen bezeichnet und sind Gegenstand der Patentanmeldung. Sie sind maßgeblich bestimmend für die ADMET-Profile von Wirkstoffen. In der hier vorliegenden Erfindung ist die Definition von "nicht-Target-bezogenen Wechselwirkungen" gleichzusetzten mit "physiologischen Nebenwirkungen" und "unphysiologischen Wechselwirkungen".

Es sei an dieser Stelle vermerkt, daß bei der Bestimmung zellulärer und/oder subzellulärer Muster aus örtlicher Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, insbesondere Proteine, RNA-Moleküle oder DNA-Segmente, die mindestens zwei verschiedenen Moleküle sowohl einer Substanzklasse (z.B. zwei verschiedene Proteine) als auch unterschiedlichen Substanzklassen (z.B. ein Protein und ein RNA-Molekül) zugeordnet werden können..

In einer bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von zellassozierten Lokalisations- und Co-Lokalisations- und Konzentrationsmustern von mindestens zwei verschiedenen Molekülen herangezogen werden. Hierbei wird mindestens eine Subpopulation von lebenden Zellen mit mindestens einer physiologisch wirksamen Substanz zu mindestens einem Zeitpunkt vorbehandelt. Anschließend wird eine Bestimmung besagter Muster entweder an lebenden oder fixierten Zellen durchgeführt.

Das Verfahren analysiert vorzugsweise nicht bekannte direkte oder indirekte Wechselwirkungspartner der zu analysierenden Wirkstoffe in Form von Molekülen, Molekülkomplexen oder von subzellulären Strukturen mindestens

einer einzelnen Zelle, einer Kollektion von Einzelzellen eines Zelltyps, von Zellen eines Zellverbandes, von Zellen eines Organs oder Organismus. Als indirekte Wechselwirkungspartner bezeichnen wir die Molekülstrukturen, die über regulatorische oder molekulare Wechselwirkungen mit dem direkten Wechselwirkungspartner in Verbindung stehen. Das Verfahren erlaubt die Detektion der Beeinflussung eines physiologischen Zustandes mindestens einer Zelle, einer Kollektion von Einzelzellen, von Zellen eines Zellverbandes, von Zellen eines Organs oder Organismus, indem zelluläre oder subzelluläre Muster aus Konzentration und Lokalisation und Co-Lokalisation oder deren übergeordnete Muster von mindestens zwei Proteinen oder RNA-Molekülen oder DNA-Segmenten in mindestens einer Sub-Population von Zellen bestimmt werden. Es ist möglich, daß sich organspezifische Nebenwirkungen oder toxische Effekte nur an bestimmten Subzelltypen äußern, die mit bereits bekannten Verfahren niemals nachweisbar wären, die über eine Vielzahl von Zellen mitteln, wie die Analyse von Expressionsmustern über mRNAs, die aus mehr als einer einzigen Zelle präpariert werden. Das Verfahren kann auch charakteristische Muster identifizieren, die sich in einer kleinen Subpopulation bei einem Überschuss ansonsten nicht meßbar reagierender Zellen manifestieren. Das Verfahren ist aber erfindungsgemäß auch auf differenzierte homogene Zellpopulationen oder funktional differenzierte Zelltypen anwendbar, wie sie nach Differenzierung aus embryonalen oder adulten Stammzellen herstellbar sind oder abgeleitet werden können. Hier können in besonders vorteilhafter Weise reversible oder irreversible Veränderungen an erfindungsgemäß mindestens zwei Molekülen studiert werden, deren Lokalisation, Co-Lokalisation und Konzentration exemplarisch den funktionalen Status einer entsprechend differenzierten Zelle beschreiben.

Überraschenderweise sind es eben nicht nur schwankende Proteinkonzentrationen an sich, wie man es aufgrund der RNA-Muster oder Proteinmuster bereits bestehender Verfahren vermuten könnte, sondern charakteristische Verschiebungen der relativen Konstellationen von Proteinen in den Zellen, die spezifische Effekte auf Transportprozesse oder auf den Energiestoffwechsel hindeuten. Dadurch entstehen charakteristische Musterbildungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene im Sinne von lokalen

Verteilungsmustern, die einen bestimmten Funktionszustand im Organ oder Organismus abbilden können. Unterschiedliche Verteilungsmuster können sich ausbilden, ohne daß notwendigerweise absolute Konzentrationsveränderungen der betrachteten Molekülstrukturen bezogen auf die Gesamtzelle oder auf einen Zellverband notwendig sind oder nachweisbar wären.

Bekannt ist ein Verfahren zur Identifikation von Targets und zur Identifikation pathologischer Zustände von Zellen oder Organismen, bei dem die Lokalisation oder Co-Lokalisation oder Konzentration pathologisch veränderter Proteine mit zellulärer oder subzellulärer Auflösung identifiziert werden (W. Schubert, US Pat. 6,150,173; T. Nattkemper, WO 01/36939). Hier werden diejenigen Proteine identifiziert, die durch einen pathologischen Prozess selektiv bezogen auf Subtyp einer Zelle, Konzentration, Lokalisation und Co-Lokalisation im Vergleich zu anderen Proteinen verändert sind. Die Konzentrationsbestimmung kann hierbei erfolgen, indem nur festgestellt wird, ob ein entsprechendes Detektionssignal oberhalb oder unterhalb eines gewählten Schwellwertes liegt. Diese Targets und ihre zugehörigen Signaltransduktionsketten sind es, die durch Einwirkung eines Medikamentes spezifisch beeinflußt werden. Aus diesem Grund hat das Verfahren große Bedeutung bei der Diagnose pathologischer Zustände, der Identifikation von pharmakologisch angreifbaren Targets und der Analyse von Pharmaka auf eben diese Targets und Mitglieder derselben Targetfamilie. Diese beschriebenen Wechselwirkungen betrachten wir als Target-bezogene Wechselwirkungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Anwendung des in US Pat. 6,150,173 beschriebenen Verfahrens, dessen Inhalt hiermit einbezogen wird, auf solche Moleküle, die nicht mit einem pathologischen Phänotyp oder Target assoziiert sind, sondern mit Molekülen, deren veränderte Muster in Lokalisation oder Co-Lokalisation oder Konzentration ein zuverlässiger und früher Indikator für reversible oder irreversible Langzeitwirkungen von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte darstellt. Hierunter verstehen wir die nicht-Target-bezogenen

Wechselwirkungen. Unphysiologische Verbindungen bezeichnen im Sinne der vorliegenden Erfindung synthetisch chemische oder biochemische Verbindungen oder Biopolymere, die kein Syntheseprodukt des zu analysierenden Organismus darstellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist kostengünstig und sensitiv, lange bevor mit oben beschriebenen Methoden grobe Veränderungen makroskopisch detektierbar werden. Pathologische Zustände sind mit Targets und dem zugehörigen Targetnetzwerk assoziiert. Medikamente sollen für die Reversion dieser Veränderung sorgen oder die Reversion funktional dadurch bewirken, daß an einer oder mehreren spezifischen Stellen ein Medikament eine phänotypische Kompensation bewirkt. Im Gegensatz hierzu bezieht sich die vorliegende Erfindung gerade auf die Gruppierung von Proteinen eines Organismus in ihrer Gesamtheit oder in Teilmengen, die nicht mit dem Target-Netzwerk bzw. dem Kompensationsnetzwerk verknüpft sind, das einen pathologischen Phänotyp neutralisiert. Diese Proteine sind bezogen auf Lokalisation oder Co-Lokalisation oder Konzentration aber geeignet, Einflüsse von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte außerhalb der eigentlichen Targetwirkung anzuzeigen.

In an sich bekannter Weise werden Zellen oder Organschnitte auf eine Weise fixiert, daß alle makromolekularen Bestandteile relativ zueinander in der nativen räumlichen Konstellation zueinander erhalten bleiben. Bindemoleküle wie Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide die direkt oder indirekt mit einem optischen Marker, vorzugsweise mindestens einem Fluoreszenzmarker gekoppelt sind, können im geeigneten Medium mit dem fixierten Substrat in Kontakt gebracht werden, so daß genügend affine Bindemoleküle an ihre fixierten Bindungspartner koppeln können. Überschüssige Bindemoleküle werden durch einen Waschprozess aus dem Substrat entfernt. Anschließend werden mit einer geeigneten Meßapparatur die optischen Marker mit hoher Ortsauflösung über ihre optische Qualität detektiert und registriert und bezüglich Lokalisation, Co-Lokalisation und Konzentration in Datenform gespeichert. Die Konzentrationsbestimmung kann hierbei erfolgen, indem nur festgestellt wird, ob ein entsprechendes Detektionssignal oberhalb oder

unterhalb eines gewählten Schwellwertes für das jeweilige Meßvolumenelement liegt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird in einem Folgeschritt der optische Marker deaktiviert. Dies kann durch Strahlungseinwirkung oder durch chemische Reaktion geschehen. Diese grundsätzliche Schrittfolge kann zyklisch wiederholt werden durch Reaktion mit einem oder mehreren weiteren Bindemolekül-Typen. Bei diesem Verfahren kommt vorzugsweise immer wieder derselbe optische Marker oder Fluorophor zum Einsatz, um jegliche optische Aberration über alle Zyklen hinweg konstant zu halten.

Eine hohe Spezifität der Bindemoleküle ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zweitrangig. Es können auch mehrere Bindemolekültypen gleichzeitig oder in Gruppen eingesetzt werden. Einzig die Musterbildung aus Lokalisation, Co-Lokalisation und Konzentration ist erfindungsgemäß informativ und indiziert eine biologische Auslenkung von einem bekannten physiologischen Referenzstatus. Diese Musterbildungen dienen als Surrogatmarker für den Phänotyp einer nicht-Target bezogenen Nebenwirkung. Sie steht nicht notwendigerweise direkt in Beziehung zum nicht-Target bezogenen Wirkort. Die Analysen werden bevorzugt am gesunden Organismus, an Organen, Gewebe oder Zellen durchgeführt, wenn die Wechselwirkungen mit nicht-Target-assoziierten Molekülen gemessen werden sollen. Die Musterinterpretation geschieht vorzugsweise im Anschluß an die mindestens eine oder die zyklischen Messungen. Algorithmen erkennen bezogen auf Volumenelemente oder Gruppen von Volumenelementen bestimmte Konstellationen von Färbungen, die für einen spezifischen Zustand wie einen irreversiblen Toxizitätseffekt oder eine reversible Wechselwirkung charakteristisch sind. Sie können im Rechner sortiert werden und in unterschiedlicher Konstellation dargeboten werden, so daß Einflüsse von Substanzen auf ein zelluläres Geschehen hervorgehoben werden. Aus der Art der bestehenden Muster kann unmittelbar auf die Natur der musterbildenden Moleküle zurückgeschlossen werden. Minimale Muster als charakteristische Muster spezifischer reversibler Nebenwirkungen oder irreversibel toxischer Wirkungen werden identifiziert und können bestimmten Zelltypen oder ihren Differenzierungsstadien oder Alter zugeordnet werden.

Das Auftreten dieser Muster belegt auch die Anwesenheit des zu untersuchenden Wirkmoleküls. Damit kann die Anwesenheit, Konzentration und zeitliche Kinetik von Konzentrationsverschiebungen registriert werden. Charakteristische Muster, vorzugsweise Minimalmuster, künden beispielsweise von beginnender Dedifferenzierung, Apoptose, unterschiedlicher Zellmorphologie oder Organellmorphologie, Entzündung, Autoimmunreaktion oder dem Verlust eines spezifischen Funktionsmusters eines differenzierten Zelltyps etc.

Bei dem hier vorgestellten Verfahren werden bestimmte Moleküle in Zellen oder Zellverbänden von beispielsweise Organschnitten quantifizierend mit einer Ortsauflösung von  $< 20\mu\text{m}$ , vorzugsweise kleiner  $10\mu\text{m}$ , vorzugsweise kleiner  $2\mu\text{m}$  bestimmt. Dadurch lassen sich auf Einzelzellebene bzw. auf subzellulärem Niveau co-lokalisierte Molekülkonstellationen und Muster von co-lokalisieren Molekülkonstellationen im Sinne von Molekülmustern bestimmen. Zusätzlich lassen sich zur Musterbildung auch Entfernungskordinaten zwischen einzelnen Meßpunkten verwenden. Damit werden Muster digitalisierbar und werden einer statistischen Auswertung auf Einzelzellebene bzw. subzellulärer Ebene zugänglich. Muster, die mit bestimmten Phänotypen korrelieren, nennen wir im folgenden CAMP (compound associated marker pattern).

Die subzellulären Muster werden identifiziert, indem durch optisch unterscheidbare Marker-markierte Antikörper oder optisch unterscheidbare Marker-markierte Bindemoleküle oder Gruppen solcher Bindemoleküle Muster generiert werden, indem einmalig durch mindestens zwei optisch unterscheidbare Antikörper oder Bindemoleküle oder im zyklischen Ablauf sequentiell die jeweils spezifischen Antikörper oder Bindemoleküle mit der fixierten Probet, enthaltend mindestens eine Zelle, Gewebe, Organ oder Organismus zur Reaktion gebracht werden. Es wird die topologische Verteilung und Intensität der optischen Signale registriert.

Dies geschieht im Falle einer zyklischen Vorgehensweise, bevor bei zyklischen Anschlußschritten nach einem Ausbleichschritt der gebundenen

optischen Marker zu Beginn des Folgezyklus der nächste Antikörper oder das nächste Bindemolekül zur Reaktion gebracht wird. Hierbei können zwei oder eine Vielzahl von Zyklen durchlaufen werden.

Jeweilige CAMPs stellen sich als ein zweidimensional aufgelöstes kombinatorisches Muster der Proteinlokalisierung und Co-Lokalisierung dar. Es wird erfindungsgemäß von individuellen Zellen, Gewebe, Organen oder ganzen Organismen erhalten. Für eine Musterbildung werden mindestens zwei verschiedene Proteine herangezogen, vorzugsweise aber eine Anzahl wie 5, 10 oder noch mehr, sobald oder solange, bis eine stabile Musterbeschreibung erhalten wird.

Ein CAMP wird einer zellulären oder subzellulären zweidimensionalen Ortskoordinate oder in einer alternativen spezifischen Ausführungsform einer Zeitkoordinate zugeordnet und wird typischerweise mit einem Binärcode beschrieben. Jede Position des Binärcodes entspricht einem Protein bzw. dem zugehörigen Nachweisreagenz wie einem markierten Antikörper. Für jedes dieser Proteine wird über ein Kalibrierungsverfahren ein Schwellwert definiert. Liegt der zugehörige Wert im Meßelement oberhalb des Schwellwertes, so wird für die entsprechende Position im Binärcode eine 1 zugeordnet. Liegt der zugehörige Wert im Meßelement unterhalb des Schwellwertes, so wird für die entsprechende Position im Binärcode eine 0 zugeordnet. Mit zwei Proteinen können sich somit 4 unterschiedliche Muster ergeben (11, 10, 01, 00). Mit drei Proteinen können sich entsprechend 8 unterschiedliche Muster ergeben (111, 110, 101, 011, 001, 010, 100, 000), usw.. Für die Darstellung der Muster bieten sich verschiedene Verfahren an, die in den Ausführungsbeispielen beschrieben sind.

Erfindungsgemäß wird ein charakteristisches zelluläres Molekülmuster dadurch gebildet, daß mindestens 2 definierte Moleküle individuell mit optischer Auflösung eines Meßvolumenelementes von der Dimension einer Zelle oder einem optisch aufgelösten Meßvolumenelement als Teilvolumenelement einer Zelle der Zahl 0 oder 1 zugeordnet werden, je nachdem ob die jeweilige Konzentration über oder unter einem zuvor



bestimmten Schwellwert liegt, oder wobei mindestens ein charakteristisches subzelluläres Molekülmuster aus Molekülmustern der einzelnen subzellulären Teilvolumenelemente einer Zelle oder eines Zelltyps gebildet wird.

Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die örtliche Auflösung zur Bestimmung der zellulären Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration in eine zeitliche Auflösung zu transformieren. Hierzu können z.B. einzelne Zellen in einem elektrischen Feldkäfig, wie in DE 197 23 873.4 (Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von Objektbewegungen) beschrieben, gehalten und mit bestimmter Frequenz gedreht werden. Das optische Detektionsvolumen bleibt ortsfest, aber die Zelle rotiert in der Probe, wobei die abgetasteten Volumenelemente der Zelle im Takt der Rotationsfrequenz wiederkehrend das Meßvolumen passieren. Ähnlich wird bei einem Punktskanner, wie es beispielsweise das konfokale Laserscanning-Mikroskop darstellt, die Information zunächst zeitlich sequenziell aufgenommen. In einem zweiten Schritt kann aus solchen Zeitreihen ein orts aufgelöstes Bild rekonstruiert werden, für das beschriebene Verfahren ist dies aber nicht zwingend notwendig. Es reicht in vielen Fällen, die Zeitreihe nach dem zeitlich gemeinsamen oder jeweils einzelnen Vorkommen der mindestens zwei Proteine, DNA oder RNA oder aber deren Abwesenheit auszuwerten. Zum Beispiel kann, ohne die Methode darauf einzuschränken, das gemeinsame Vorkommen der Proteine, DNA oder RNA über Kreuzkorrelation der beiden Zeitreihen quantifiziert werden, während das einzelne Vorkommen aus Differenz der Autokorrelation und Kreuzkorrelation errechnet werden kann. Ein anderes Beispiel geeigneter mathematischer Transformationen sind Fourier- und Laplacetransformationen wie auch Wavelet-Transformationen, deren Argumente räumliche und/oder, wie vorangehend bereits beschrieben, zeitliche sein können. Insbesondere können dabei Transformationen mit variablen Argumenten für bestimmte Abstände verwendet werden. Beispielsweise gibt die Kreuzkorrelation  $F(x) \cdot G(x-a)$  an, wie viele Proteine den Abstand  $a$  voneinander aufweisen.

Das Verfahren ist auch geeignet, Genotyp-assoziierte Unterschiede im phänotypischen Reaktionsverhalten auf nicht-Target-bezogene Interaktionen

von Wirksubstanzen oder ihrer Metabolite zu studieren. Hierzu werden Zellen, Gewebe oder Organismen unterschiedlichen Genotyps für die erfindungsgemäße Analyse herangezogen.

In einer zweiten erfindungsgemäßen Ausführungsform werden die subzellulären Muster durch optisch unterscheidbare Marker-markierte Antikörper oder optisch unterscheidbare Marker-markierte Bindemoleküle oder Gruppen solcher Bindemoleküle generiert, indem die jeweils mindestens zwei spezifischen Antikörper oder Bindemoleküle mit der fixierten Probe, enthaltend mindestens eine Zelle, Zellverband, Organ oder Organismus, zur Reaktion gebracht werden und die topologische Verteilung der jeweiligen Antikörper über unterscheidbare optische Signale zugeordnet wird. Solche optisch unterscheidbaren Signale werden durch unterschiedliche Excitationswellenlängen oder Emissionswellenlängen generiert, durch unterschiedliche Energietransfereffekte (FRET), durch unterschiedliche Intensitäten, Polarisierung, oder Lebensdauer der angeregten Zustände oder Kombinationen der vorgenannten unterscheidbaren Signale. In einer bevorzugten Ausführungsform der hier beschriebenen Erfindung sind die optisch unterscheidbaren Marker fluoreszierende Marker.

Anstelle der Anfärbung von Proteinen im fixierten Zustand der Zelle lassen sich erfindungsgemäß auch lebende Zellen analysieren, indem Zellen auf eine Weise nach Standardmethoden rekombinant hergestellt werden, daß mindestens zwei Proteine in situ Fluoreszenz-markiert werden, deren Lokalisation und Co-Lokalisation zur erfindungsgemäßen Auswertung herangezogen werden. GFP (green fluorescent protein) und seine Varianten oder andere fluoreszierende Domänen lassen sich N- oder C-terminal an offene Leserahmen von Domänen der interessierenden funktionalen Proteine ankoppeln. Mit automatisierten Systemen wie dem Opera (Evotec Technologies, Germany) lassen sich gleichzeitig verschiedene Parameter von fluoreszierenden Liganden an lebenden oder fixierten Zellen beobachten wie unterschiedliche Excitations- oder Emissionswellenlänge, wie unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauer, Energietransfer (FRET) oder Fluoreszenzintensität. Auf diese Weise lassen sich auch in situ an lebenden

Zellen unterschiedlich markierte Proteintypen unterschiedlichen Lokalisationen und Co-Lokalisationen zuordnen. Mindestens zwei dieser Proteintypen können dabei als Surrogatmarker fungieren.

Wirkung, Nebenwirkung oder Toxizität von Wirksubstanzen lassen sich erfindungsgemäß auch über morphologische Muster identifizieren, wenn Zellen oder auch Zellorganellen innerhalb oder außerhalb ihres Gewebeverbandes ihre Form verändern. Daraus ergeben sich unterschiedliche, charakteristische Verteilungsmuster bzw. Abstandsmuster, die erfindungsgemäß identifiziert werden können.

Als bevorzugt eingesetzte Proteinmarker werden unter anderem Proteine gewählt, die zu der Gruppe von Proteinen gehören, die in der Tabelle 1 gelistet sind. Meist werden neben anderen Proteine mindestens 5 Proteine aus dieser Liste analysiert. Die Proteine werden in einem oder mehreren spezifischen Zelltypen innerhalb eines Gewebes oder Organs exprimiert. Grundsätzlich kommen alle vorkommenden Proteine, Peptide, DNA-Segmente oder RNAs als Markerkandidaten infrage.

Die Analysen können an Zellkulturen oder Gewebekulturen, an Organkulturen, ex vivo-Organen oder ganzen Organismen durchgeführt werden. Anstelle der Analyse toxikologischer Endpunkte, lassen sich initiierte ADMEtox Wirkungen analysieren bzw. reversible Wirkungen, deren fatale Folgen ansonsten im übergeordneten Organismus noch nicht manifest werden. Auf diese Weise werden Zeit und Kosten gespart. Es kann frühzeitig verhindert werden, weitere Entwicklungskosten in neue chemische Verbindungen zu investieren, die langfristig an Toxizitätsproblemen scheitern würden. Es lassen sich natürlich frühzeitig aus größeren Hit-Kollektiven auch solche Strukturen identifizieren, die bei gewünschter Wirkung bestimmte Tox-Profile nicht aufweisen und somit geeignete Kandidaten für die medizinisch chemische Optimierung darstellen.

Bei Tierexperimenten oder auch humanpathologischen Proben werden als Gewebe oder Organe meist Leber, Niere, Lunge, Herz, Bauchspeicheldrüse,

Muskeln, Gehirn, Hoden, Eierstöcke, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Rektum, Augen und Knochen analysiert. In der Zukunft werden aber vermehrt differenzierte Stammzellen als gut reproduzierbare biologische Testsysteme zum Einsatz kommen.

Innerhalb von Organen sind toxische Effekte nicht notwendigerweise gleich verteilt, bzw. Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes oder seiner Stoffwechselprodukte zeigen differierende Konzentrationen und zeitliche Verläufe nach Applikation (Pharmacokinetik und Pharmacodynamik). So können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in der Leber Kupferzellen, Sinusoidalzellen, Itozellen, Hepatocyten, Gallenblasenepithelzellen, Endothelzellen der hepatischen Venole und sinusoidale Endothelzellen bezüglich toxischer Effekte differenziert werden. Hierzu werden zusätzlich zu Indikatorproteinen für die toxischen Effekte Markerproteine für die Analyse herangezogen, die als Indikator für den zugehörigen Zellsubtyp dienen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt, daß sich toxische Effekte von Substanzen auf Organe zunächst selektiv auf bestimmte Zellsubtypen in einem betroffenen Organ konzentrieren und hier erfindungsgemäß selektiv nachgewiesen werden können. Hier besteht der entscheidende Unterschied zu Verfahren, bei denen auf mRNA-Ebene (Transkriptom) oder Protein-Ebene (Proteom) Analysen der Quantität bestimmter RNAs oder Proteinen auf der Basis eines Gemisches aus einer Vielzahl von Zellen aus einem Organ oder Gewebe erfolgen. Bei diesen Verfahren geht man immer von mehreren Zellen aus, meist von 10.000 bis 100.000. Hierin befinden sich fast immer Zellen unterschiedlichen Subtyps (differenziert/dedifferenziert, Muskelzellen, Endothelzellen, Blutzellen und mehr). Die erfindungsgemäße Methode identifiziert charakteristische Toxizitätsmuster über statistische Messungen an Einzelzellen, bzw. Unterkompartimenten von Einzelzellen. Dies erklärt die Empfindlichkeit der erfindungsgemäßen Methode gegenüber nicht-Einzelzell-basierten Verfahren.

Im Vergleich zu bestehenden Verfahren auf Gen-, Gen-Transkriptions- und Proteinebene läßt sich folgendes feststellen. Bisher beschriebene Verfahren

können in Gewebeproben oder Zellkulturen individuelle Gene, Gen-Transkripte, prozessierte Gentranskripte und Proteine quantitativ erfassen und Gruppen charakteristischer individueller Gene, Gen-Transkripte, prozessierter Gentranskripte und Proteine identifizieren. Dies ist auch eine Art Musterbildung, aber sie basiert auf Gemischen von einer Vielzahl von Zellen, die, wenn sie aus einem Organismus oder einem Organ gewonnen werden, immer eine Mischung unterschiedlicher Zelltypen oder physiologischer Zustände wie „in Zellteilung befindlich“ oder „ruhend“ darstellen. Solche Zellen können aber in ganz unterschiedlicher Weise auf Substanzen reagieren. So sind in einem Tumorgewebe meistens auch nur bestimmte Zellen degeneriert. Bei bereits bekannten Verfahren wird vorgeschlagen, in einer aufwendigen Prozedur aus Gewebe oder Organproben Einzelzellen zu entnehmen, in Kultur aufzunehmen, um anschließend genügend Material einer spezifischen Zelllinie zu generieren und dann ein zellspezifisches Proteinmuster zu generieren. Mit diesem Verfahren soll dem bei anderen Verfahren zugrundeliegenden Problem der zellulären Inhomogenität von Gewebeproben begegnet werden, die bei dem hier vorliegenden Verfahren keine Rolle spielen. Bei der vorliegenden Erfindungsmeldung wird auf die Analyse von Einzelzellen in Geweben abgehoben, die es erlauben, nebeneinander unterschiedliche CAMPs zu identifizieren.

Mit Verfahren, deren Signale über eine Mehrzahl von Zellen gemittelt werden, könnten derartige Signale leicht verdeckt werden bzw. im Rauschen untergehen. Zudem sind natürlich Muster von RNAs bekannterweise kein zuverlässiger Marker für die Existenz des zugehörigen Proteins in der einzelnen Zelle, geschweige einer korrekten Protein-Prozessierung, Lokalisation oder korrekten Co-Lokalisation im Verbund funktional interagierender Proteine.

Der Quantifizierbarkeit und Digitalisierbarkeit wird für die toxikologische und pharmakokinetische Beurteilung von Wirkungen unphysiologischer Substanzen große Bedeutung beigemessen. Die Erfahrung hat gezeigt, daß sich bei der subjektiven Beurteilung pathologischer Präparate wie Zellen oder

Gewebe häufig sehr unterschiedliche Resultate hervorgehen, abhängig vom Erfahrungshorizont der beteiligten Fachleute und ihrer jeweiligen Priorisierung.

Viele, nicht-Target-bezogene Phänotypen sind beschrieben worden. Sie stehen nicht alle gleichberechtigt nebeneinander. Vielmehr treten sie oft in Gruppen gemeinsam auf oder sind zeitlich hierarchisch geordnet, häufig im gemeinsamen Endpunkt Apoptose oder Nekrose einmündend. Sie betreffen molekulare Ereignisse, eine Einzelzelle, ein Gewebeareal oder Gewebetypus, oder den gesamten Organismus. Spezifische Phänotypen sind beschrieben als AH-Antwort, Akuter Phasenstress, Antimetabolismus, anti-Apoptose und Apoptose, Antiproliferation, Aufbrauch der ATP Reserven, Autoimmunreaktionen, Cholestase, De-/Differenzierung, DNA Schaden, DNA Replikation, Entzündung, Entzündungsreaktionen, Fettleber, Fibrose, Freisetzung von Arachidonsäure, frühe Genantworten, genereller Zellstress, Glucoseentzug, Hitzeschock, Hypercholesterolemie, Hypoxie, Hypersensitivität, Immunotoxizität, Invasion, Ionentransport, Lebertoxizität, Leberregeneration, Mitochondrienfunktion, Mitoseinduktion, Multidrug-resistenz, Nierentoxizität, Östrogenizität, oxidativer Stress, Peroxisomenproliferation, Peroxisomenschaden, Rekombination, Ribotoxizität oder ribotoxischer Stress, Sclerose, Steatosis, Stress des endoplasmatischen Reticulums, Teratogenese, Transformation, Unterbrechung der Translation, Transport, Tumorsuppression, Unterbrechung des Zellzyklus, Wachstumsstopp, Zerstörung der zellulären Matrix, Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation, Zellregeneration, Zell-Zell Kommunikation. .

Von besonderem Anwendungsinteresse sind Musteridentifikationen, die mit einem Phänotyp als Folgeerscheinung einer Verabreichung einer toxisch wirkenden Substanz assoziiert sind, bei der eine Schädigung auf dem Niveau von Proteinen, Proteinkomplexen, Nukleinsäuren, Organellen, Gewebe, Organen oder Systemen eines Individuums erfolgt. Dies ist für die Aufschlüsselung der Wirkprofile und Nebenwirkungsprofile neuer pharmakologischer Wirkstoffkandidaten von besonderem Interesse.

Für eine Reihe bekannter Marker-Substanzen sind spezifische Tox-Effekte beschrieben: AH-Antwort, Akuter Phasenstress, Antimetabolismus, anti-Apoptose und Apoptose, Antiproliferation, Aufbrauch der ATP Reserven, Autoimmunreaktionen, Cholestase, De-/Differenzierung, DNA Schaden, DNA Replikation, Entzündung, Entzündungsreaktionen, Fettleber, Fibrose, Freisetzung von Arachidonsäure, frühe Genantworten, genereller Zellstress, Glucoseentzug, Hitzeschock, Hypercholesterolemie, Hypoxie, Hypersensitivität, Immunotoxizität, Invasion, Ionentransport, Lebertoxizität, Leberregeneration, Mitochondrienfunktion, Mitoseinduktion, Multidrug-resistenz, Nierentoxizität, Östrogenizität, oxidativer Stress, Peroxisomenproliferation, Peroxisomenschaden, Rekombination, Ribotoxizität oder ribotoxischer Stress, Sclerose, Steatosis, Stress des endoplasmatischen Reticulums, Teratogenese, Transformation, Unterbrechung der Translation, Transport, Tumorsuppression, Unterbrechung des Zellzyklus, Wachstumsstopp, Zerstörung der zellulären Matrix, Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation, Zellregeneration, Zell-Zell Kommunikation. Diese Marker-Substanzen dienen bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens dazu, identifizierte CAMPs Toxizitätsmustern zuzuordnen. Derartige Toxizitätsmuster können somit ganz bestimmten Toxizitätssubtypen zugeordnet werden. Auf diese Weise können neue Muster mit den so zuvor festgelegten Mustern verglichen werden. Dadurch lassen sich unbekannte Substanzwirkungen bereits bekannten Toxizitätssubtypen zuordnen. Wenn für bestimmte Tox-Phänotypen wie beispielsweise Hypersensitivität Wildtyp und Mutante als testbare Zellen oder Gewebe zur Verfügung stehen, können die als charakteristisch identifizierten Muster weiter abgesichert werden.

Das Verfahren erlaubt die Identifikation und Festlegung derart charakteristischer Proteinmuster auf Einzelzelebene oder subzellulärer Proteinmuster (CAMP) als charakteristische Surrogatmarker für definierte Phänotypen als Reaktion auf eine Interaktion mit mindestens einer chemischen oder biologischen Substanz, deren Derivate oder Abbauprodukte. Es werden CAMPs identifiziert, indem Vergleiche von Mustern durchgeführt werden, die mit einem spezifischen individuellen Phänotyp korrelieren. Hierbei gleichen sich bei unterschiedlichen Individuen diese Phänotypen und

lassen sich spezifisch von entsprechenden Mustern abgrenzen, die man von analogen Geweben aus Individuen erhält, die den entsprechenden Phänotyp nicht aufweisen oder die nicht mit der mindestens einen chemischen oder biologischen Substanz in Kontakt gebracht werden.

Wenn für bestimmte Tox-Phänotypen wie beispielsweise Hypersensitivität sowohl Wildtyp als auch Mutante als testbare Zellen oder Gewebe zur Verfügung stehen, können die als charakteristisch identifizierten Muster weiter abgesichert werden. Nicht nur Veränderungen von zellulären oder subzellulären Proteinmustern gegenüber einem definierten Wildtyp oder Normalzustand sind ein Indikativ für Wechselwirkungen einer Substanz mit Zellen oder Geweben. Es lassen sich auch spezifische Muster (CAMPs) für bestimmte Phänotypen im Sinne einer spezifischen Reaktion einer Zelle auf die Interaktion mit einer Substanz identifizieren.

Das Verfahren läßt sich auch einsetzen, um Aussagen über Aufnahmegeschwindigkeit, Verteilung im Organismus, Metabolismus und Ausscheidung von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte zu machen. Veränderungen im Muster von nicht-Target-bezogenen Proteinen indizieren Anwesenheit und Konzentration dieser Verbindungen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Applikation. Nicht die Verbindungen selbst, wie sonst bei Verabreichung radioaktiver Analoga, sondern ihre nicht-targetbezogenen Wirkungen sind erfindungsgemäß Gegenstand der Analytik.

Es lassen sich darüber hinaus auch Aussagen zur Bioverfügbarkeit von applizierten Substanzen in Geweben erheben. Unphysiologische Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte verteilen sich niemals homogen über einen Organismus. Sie können mitunter die Blut-Hirnschranke nicht überwinden, sie überstehen die Leberpassage nicht, sie bleiben an bestimmten Proteinen wie Transportproteinen langfristig gebunden, sie reichern sich in bestimmten Organen oder Organellen an, sie verhalten sich unterschiedlich im unterschiedlichen genetischen Kontext der Individuen.



Handelt es sich bei den zu untersuchenden Molekülen nicht um kleine synthetische Moleküle, sondern um Moleküle wie monoklonale Antikörper, Pharmaproteine oder Nukleinsäuren oder ihre Derivate lassen sich an diesen Molekülen Fluoreszenzmarker ankoppeln, die das physiologische Verhalten nicht maßgeblich beeinflussen. Diese Moleküle lassen sich direkt in ihrem Weg und in der jeweiligen Konzentrationsverteilung mit zellulärer oder subzellulärer Auflösung quantifizierend verfolgen und mit der Kinetik sich einstellender Nebenwirkungen oder toxischer Effekte verknüpfen.

Mitunter lassen sich unerwünschte physiologische Effekte erfindungsgemäß nur an Subpopulationen von Zellen eines Gewebes, Organs oder Organismus aufdecken. Hierbei kann es sich um unterschiedlich differenzierte Zelltypen oder einzelne Zellen eines ansonsten einheitlichen Zelltyps handeln.

Neben der Erfassung der Toxizitätswirkungs- oder Nebenwirkungsspezifischen Muster werden bevorzugt auch Indikatoren zur Erfassung des zellulären Subtyps des orts aufgelösten Meßvolumenelementes erfaßt. So können spezifische Nebenwirkungen auch mit spezifischen Zelltypen assoziiert werden oder auch einem spezifischen Differenzierungsstatus eines Zelltyps, in einer bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung von differenzierten Stammzellen. Es lassen sich so auch neue Wirkmechanismen identifizieren, die auch bislang unbekannte positive pharmakologische Effekte an sich bereits bekannter Wirkstoffe anzeigen können. Nebenwirkungen können auch Indikatoren für alternative Wirkprofile und neue Wirkungsmechanismen an sich bekannter Wirkstoffe bedeuten. Auf diese Weise lassen sich somit auch neue Targets detektieren, wenn sich pharmakologisch interessante Nebenwirkungen ergeben.

Die Methode identifiziert typischerweise auch solche Ereignisse in einem komplexen Substrat wie einem Organschnitt, bei dem die Konstellation unterschiedlicher Zelltypen untereinander variiert, z.B. indem Zellen im Verband rearrangiert werden, z.B. die chemotaktische Attraktion von Astrozyten im Gehirn und ihre Aktivierung oder Einflüsse auf das Muster der unterschiedlichen Mobilisierungsstadien, Differenzierungsstadien oder

Umwandlungen von Differenzierungsstadien, die von nicht-physiologischen Substanzen induziert werden.

Viele Nebenwirkungen sind abhängig vom getesteten Individuum bzw. seines sogenannten Genotyps. Deshalb ist es wichtig, über ein Verfahren zu verfügen, das es erlaubt, zu Beginn der pharmazeutischen Wirkstoffoptimierung zu testen, ob bei Kollektiven unterschiedlicher Genotypen und spezifischer Populationen unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit gleiche oder unterschiedliche Muster von Nebenwirkungen oder Toxizitätseffekte in Zellen, Geweben oder Organen identifiziert werden können. Gesucht sind nebenwirkungsarme Wirksubstanzen für eine Mehrzahl oder gar alle Genotypen einer Spezies.

Aus diesem Grunde löst die vorliegende Erfindung auch wichtige Fragestellungen in Bezug auf Wirkungen von unphysiologischen Verbindungen, deren Derivate oder Abbauprodukte bei unterschiedlichen Individuen, die sich letztlich auf differierende genetische Konstellationen zurückführen lassen. Anstatt diese Wirkungen indirekt mit Gen-Mutantenmustern (SNPs; single nucleotide polymorphisms) zu korrelieren, lassen sich die nicht-Target-bezogenen Wirkungen direkt über die Funktionen auf Proteinebene analysieren. Selbst wenn es damit nicht möglich ist, prospektiv aufgrund eines genetischen Fingerprints die Populationen zu ermitteln, die nicht mit der getesteten unphysiologischen Verbindung, deren Derivaten oder Abbauprodukten in Berührung kommen sollten, so läßt sich doch bei der chemischen Entwicklung der Substanzen ermitteln, ob überhaupt und in welchem Maßstab Teilpopulationen ungünstig oder unterschiedlich auf die Verbindungen reagieren.

Interessant sind insbesondere auch toxische Phänotypen, die mit einer spezifischen ethnischen Gruppe, Geschlecht oder Altersgruppe assoziiert sind.

Nicht alle Organismen oder Individuen reagieren mit derselben Empfindlichkeit auf den Kontakt mit neuen Substanzen. Auf die genotypischen

Unterschiede und die Bedeutung im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde bereits hingewiesen. Es gibt aber auch klassifizierte Mutanten oder bestimmte Genotypen, die für ihre generelle Empfindlichkeit gegenüber neuen Substanzen bekannt sind und die man als hypersensitive Mutanten bezeichnen kann. Patienten mit entsprechendem Profil oder Prädisposition neigen zur allgemeinen starken Überreaktionen gegenüber neuen Substanzen. Sie reagieren hypersensitiv. Entsprechende Mutanten gibt es als Testorganismen oder Testgewebe. Erfindungsgemäß lassen sich derartige Hypersensitivitäts-Testorganismen im Vergleich zu Normal-Organismen einsetzen, um charakteristische Vergleichsmuster zu generieren.

Das Verfahren erlaubt es auch, über zeitlich variierende Musterbildungen physiologische Kompensationsmechanismen anzuzeigen sowie eine sich über Zeit aufbauende biologische Substanzaktivität bezüglich Wirkung, Nebenwirkung oder Toxizität zu detektieren

Besondere Bedeutung hat das Verfahren auch für die Analyse synergistischer Nebenwirkungen verschiedener Wirkstoffe. Wirkung, Nebenwirkung oder Toxizität von Wirksubstanzen lassen sich konzentrationsabhängig in Gegenwart mindestens einer weiteren Wirksubstanz messen.

Reversible Nebenwirkungen lassen sich von irreversiblen toxischen Effekten organspezifisch oder zellspezifisch quantifizierend oder digitalisierend differenzieren, indem der zeitliche Verlauf oder eine Reversion charakteristischer Nebenwirkungsmuster nach Absetzen der Einwirkung chemischer oder biologischer Wirksubstanzen gemessen wird. Die dabei erzielten Ergebnisse basieren auf statistischen Resultaten, die auf Einzelzellebene erhalten werden.

Neben den verabreichten Verbindungen sind für toxikologische Untersuchungen auch deren Stoffwechselprodukte von Bedeutung, die jeweils für sich oder als Gruppe von Substanzen spezifische Toxizitätsprofile aufweisen könnten. Dies läßt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren

verbinden, indem die Ausgangsverbindung mit Enzymen oder Enzymgemischen der P450-Enzyme vorinkubiert werden, oder mit der sogenannten S9 Fraktion von Leberextrakten oder mit einer Mikrosomen-Fraktion vorinkubiert werden.

Die Gewebe und Zellen von Organen des Verdauungstraktes sind naturgemäß als erste und in vergleichsweise maximaler Konzentration mit einem Wirkstoff oder Wirkstoffgemisch konfrontiert. Gewebe oder Zellen des Verdauungstraktes, insbesondere die Leber, Bauchspeicheldrüse, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Gallenblase, Niere oder Blase sind demnach von besonderem Interesse für die präklinische und klinische Forschung. Ähnliches gilt für die Leber als dem Organ, in dem sich viele pharmakologische, insbesondere amphiphile Substanzen aufkonzentrieren und durch die P450 iso-Enzyme metabolisiert werden. Deshalb ergeben sich häufig in der Leber durch Pharmaka und deren Abbauprodukte toxische Effekte, insbesondere bezüglich Fettstoffwechsel, Fettleber, Cholestase, Gelbsucht, Hepatitis, Steatose, Nekrose, Hyperplasie, Mutagenese, Tumorbildung oder Peroxisomproliferation innerhalb der Hepatozyten. Hier werden insbesondere die Proteine zur Musterbildung herangezogen, die mit Tumorbildung, Teratogenese, Immunsuppression, Pankreatitis oder Agranulozytose assoziiert sind. Aber auch die Morphologie einer beeinflussten Zelle selbst kann erfindungsgemäß zu charakteristischen CAMPs führen.

Die Niere als häufiges Ausscheidungsorgan ist ein weiteres Gewebe, das insbesondere mit Metaboliten von Wirksubstanzen konfrontiert ist, denen gelegentlich ebenfalls eine toxische Wirkung zukommen kann. Hier werden bevorzugt Proteine in die Evaluation mit einbezogen, die mit Nekrose, Glomerulitis, Nephritis, Tumorbildung, Hyperplasie, Proteinurie, Nierenschaden oder Nierenversagen assoziiert sind. Aber auch andere Organe reagieren häufig mit spezifischen Nebenwirkungsreaktionen. Dazu gehören Muskelgewebe, Herz, Blut, Haut, Augen und Nervengewebe. Entsprechend werden hier Proteine bevorzugt, deren Assoziation mit Myotoxizität, Cardiotoxizität, Bluttoxizität, Hauttoxizität, Augentoxizität oder Neurotoxizität bereits grundsätzlich beschrieben sind. Zu den beschriebenen

Phänotypen gehören Muskeldystrophien, Tachycardie, Arrhythmie, Hypotension, Hypertension, Leukämie, Neutropenie, Agranulozytose, peripherer Neuropathie, Demenz, Entzündung, Irritation, Sensibilisierung, Myelosuppression oder Retinopathie.

Weitere Proteinmarker beziehen sich auf Proteine, die mit Apoptose, Zelladhäsion, Autophagozytose, Zellzyklusstillstand, Zirkadischem Rhythmus, Zytokinsekreterierung, De-differenzierung, Differenzierung, Schädigung der Mitochondrien, Migration, Mutation, Onkose, Peroxisomproliferation, Rekombination, Seneszenz, Signalrefraktivität, Ausbreitung oder Transformation assoziiert sind.

Mit dem hier beschriebenen Verfahren hat sich überraschend gezeigt, daß mit dem Vorteil der Signalauflösung auf Einzelzellebene toxische und pharmakokinetische Effekte einzelnen Zellen und sogar einzelnen Zellkompartimenten zugeordnet werden können. Nicht nur pathologische Zustände können sich über veränderte Verteilungsmuster von Proteinen in einzelnen Zellen äußern, sondern es können sich auch pharmakokinetische Effekte ebenfalls über Veränderungen im subzellulären Verteilungsmuster äußern.

Überraschend ist die Tatsache, daß die Muster charakteristisch sind und frühzeitige Marker einer physiologischen Veränderung darstellen, nicht die relativen zellulären Konzentrationen von Proteinen selbst.

Ein wesentlicher Aspekt bei der Beurteilung von nicht-Target-bezogenen Interaktionen von Substanzen ist die reversible und irreversible Interaktion mit dem spezifisch funktionalen Leistungsprofil spezifisch differenzierter Zellen. Es hat sich in der Vergangenheit immer wieder herausgestellt, daß es eben diese funktionalen Eigenschaftsprofile sind, die durch inakzeptable Nebenwirkungen gestört werden. Beispiele sind Einflüsse auf die kontraktile Elemente von Muskelzellen oder die Veränderung von Reizleitungsprofilen bei Herzmuskelzellen, die zu einer verlängerten QT-Phase führen. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, Surrogat-Marker zu identifizieren,

die eine weitgehend unbeeinflusste Funktionalität anzeigen bzw. ihre reversible oder irreversible toxische Beeinflussung ohne notwendigerweise mit den mechanistischen Ursachen verknüpft zu sein. Sind derartige Surrogat-Marker einmal identifiziert, ist es für ein breit angelegtes Screening von großen Zahlen von chemischen oder biologischen Substanzen nicht unbedingt notwendig, eine Vielzahl zusätzlicher Marker in iterativen Prozessen zu bestimmen. Im erfindungsgemäßen Grenzfall reicht ein Zyklus aus, um aus einer charakteristisch veränderten Co-Lokalisation von nur zwei Surrogatmarkern auf eine veränderte Funktionalität eines Zelltyps zu schließen. Dabei kann die Färbung der zugehörigen Proteine auch dadurch erfolgen, daß die Proteine in situ einen optisch nachweisbaren Marker tragen.

Die Fig. 1) zeigt subzelluläre Verteilungsmuster einzelner Molekültypen (Proteine und DNA Moleküle). Die hier dargestellten Bilder wurden durch das sequentiell wiederholte Anfärben einer Zellkultur von HepG2-Zellen nach chemischer Fixierung mit fluoreszierenden Binde- bzw. Markermolekülen (im einzelnen cfos, p53, GSTalpha, Keratin, hsp 70, p170, hrar, Cytochrom C, Caspase 3, nfkappab, mito, wga, Propidiumiodid (und Phasenkontrastaufnahme), Aufnahmen einzelner Fluoreszenzbilder und anschließend Bleichen generiert. Im wesentlichen wurde das bereits bekannte Verfahren (US Pat 6.150.173 und WO 01/36939) eingesetzt. In einigen Bildern wurden durch das Anfärben einzelne subzelluläre Kompartimente spezifisch markiert. Beispiele hierfür sind der Zellkern durch Propidiumiodid (prop), Mitochondrien durch den Antikörper MitochondriaAB2 (mito) und Teile des ER und Golgi Netzwerkes durch ein Lectin (wga, wheat germ agglutinin). Des weiteren lässt sich der zytoplasmatische Bereich durch Addition einiger zytoplasmatischer Anfärbungen und Subtraktion der Kernfärbung rechnerisch definieren (siehe Fig. 2). Wenn dieses Verfahren mit mehreren Zellkulturen oder Gewebeschnitten sowohl unter Kontroll- als auch unter Testbedingungen eingesetzt wird, lässt sich die anteilmässige Verteilung einzelner Molekültypen in den unterschiedlichen subzellulären Bereichen statistisch quantifizierend bestimmen (siehe Fig. 4).

Basierend auf dem in Fig. 1 beschriebenen Verfahren wurden in Fig. 2 zwei unterschiedliche subzelluläre Bereiche einzeln aufgelöster Zellen definiert. Dargestellt in schwarz ist der Zellkern, der durch die Propidiumiodid-Färbung markiert wurde. Der zytoplasmatische Bereich ist grau dargestellt.

In Fig. 3 ist die Verteilung des menschlichen Retinsäure-Rezeptors (hRAR) in HepG2 Zellen dargestellt. Das obere Panel von vier Figuren zeigt die Verteilung des hRAR unter Kontrollbedingungen (ohne vorherige Exposition toxischer Substanzen). In dem unteren Panel ist die Verteilung des hRAR unter Testbedingungen (nach Exposition einer toxischen Substanz, (6,25  $\mu$ M cis-Platin) für 24 Stunden) dargestellt. In der Testsituation findet man den hRAR so gut wie ausschließlich im Zellkern. Unter Kontrollbedingungen läßt sich der hRAR sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektieren. Dies soll als Beispiel für ein Molekül dienen, das sich unter der Einwirkung einer toxischen Substanz innerhalb der Zelle neu verteilt. Das hier dargestellte Minimalmuster ist also die in der Konzentration (lokale Verteilung der Fluoreszenzintensität) variierende Co-Lokalisation des hRAR mit durch Propidiumiodid markierter nukleärer DNA.

Die Fig. 4 zeigt sogenannte Box-Plots der Intensitätsverteilungen von zwei Markern der Fig. 3, Marker-Antikörper gegen den humanen Retinsäure-Rezeptor hRAR und Propidiumjodid zur Anfärbung von DNA. Es werden die Daten von jeweils zwei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Experimenten gegenübergestellt. Es wird zwischen den Intensitätsverteilungen der örtlich aufgelösten Volumenelemente im Bereich der errechneten Zytoplasma-Bereiche (siehe Fig. 3, rechte TeilFig.en (grau definierte Bereiche)) der vermessenen Hepatozyten unterschieden im Vergleich zu den Intensitätsverteilungen der örtlich aufgelösten Volumenelemente in den Bereichen der Zellkerne (schwarz). Die Plots stellen jeweils die Häufigkeitsverteilungen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten in arbiträren Einheiten dar, wobei die Linien in den Boxen jeweils die Mediane der Verteilung aller ausgemessenen Volumenelemente der Kategorie „Zytoplasma“ bzw. „Zellkern“ umfaßt. Ober- und Untergrenze der Box kennzeichnen jeweils 75% bzw. 25% der Gesamtverteilung der

ausgemessenen Volumenelemente. Die eingezeichneten kurzen Querbalken markieren Einzelereignisse für einen optischen Eindruck der Intensitätsverteilungen fernab vom Median. Aus der quantifizierenden Auswertung ergibt sich in statistisch signifikanter Weise die durch cis-Platin verursachte Verringerung der zytoplasmatischen Lokalisation des Retinsäure-Rezeptors im Zytoplasma.



**Tabelle 1:** Liste von bevorzugt eingesetzten Proteinmarker. Meist werden neben anderen Proteine mindestens 5 Proteine aus dieser Liste analysiert. Die Proteine werden in einem oder mehreren spezifischen Zelltypen innerhalb eines Gewebes oder Organs exprimiert. Grundsätzlich kommen alle vorkommenden Proteine, Peptide, DNA-Segmente oder RNAs als Markerkandidaten infrage.

Genebank accession #	Protein
X94333	HSTGN46
AF248953	Homo sapiens golgi matrix protein GM130 (GOLGA2)
BC003512	Mesothelin
M22434	Carcinoembryonic antigen
U30930	GalT, galactosyl Transferase
A57013	early endosome antigen 1
P04040	Catalase
L78207	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8
AF037064	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1-like
X95715	anthracycline resistance-associated protein (ARA)
Y17151	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
S90469	P450 (cytochrome) oxidoreductase
L26318	mitogen-activated protein kinase 8
L31951	mitogen-activated protein kinase 9
U34819	mitogen-activated protein kinase 10
U22431	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
X92106	bleomycin hydrolase
L04791	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
L20046	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (xeroderma pigmentosum, complementation group G (Cockayne syndrome))

M30938	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kD)
M31899	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
M32865	thyroid autoantigen 70kD (Ku antigen)
M36089	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
M29971	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
X52221	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)
M13194	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
U07418	mutL (E. coli) homolog 1 (colon cancer, nonpolyposis type 2)
D21090	RAD23 (S. cerevisiae) homolog B
D21235	RAD23 (S. cerevisiae) homolog A
U35835	DNA-dependent protein kinase (DNA-PK); DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKCS)
U12134	RAD52 (S. cerevisiae) homolog
U33841	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)
U63139	RAD50 (S. cerevisiae) homolog
X83441	ligase IV, DNA, ATP-dependent
X84740	ligase III, DNA, ATP-dependent
U04045	mutS (E. coli) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)
U54777	mutS (E. coli) homolog 6
U13695	postmeiotic segregation 1
U13696	postmeiotic segregation increased (S. cerevisiae) 2
M36067	ligase I, DNA, ATP-dependent
D14533	xeroderma pigmentosum, complementation group A
D21089	xeroderma pigmentosum, complementation group C
X15653	uracil-DNA glycosylase
X59764	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase; AP endonuclease 1 (APE1); apurinic/apyrimidinic endonuclease (APEX); APEX nuclease (APEN);

	REF1
D13804	RAD51 ( <i>S. cerevisiae</i> ) homolog (E coli RecA homolog)
D13365	metallothionein III (MT3); brain growth inhibitory factor (GIFB)
D49547	heat shock 40kD protein 1
M34664	heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)
X07270	90-kDa heat-shock protein A (HSP90A); HSP86; HSPCA
X54079	heat shock 27kD protein 1
M11717	heat shock 70kD protein 1A
X51757	heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')
Y00371	
L26336	heat shock 70kD protein 2
X79882	major vault protein
D87292	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)
L05779	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
M63012	paraoxonase 1
X14672	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)
L13278	crystallin, zeta (quinone reductase)
M13267	cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)
U03688	cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3, primary infantile)
M33318	cytochrome P450, subfamily IIA (phenobarbital-inducible), polypeptide 6
M29874	cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible)
M13785	cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 3
L04751	cytochrome P450, subfamily IVA, polypeptide 11
X56088	cytochrome P450, subfamily VIIA (cholesterol 7 alpha-monooxygenase), polypeptide 1
X13227	D-amino-acid oxidase
M21940	S-mephenytoin 4 hydroxylase; cytochrome P450 IIC9 (CYP2C9); CYP2C10; CYP2C17; CYP2C18; CYP2C19
J02625	cytochrome P450, subfamily IIE (ethanol-inducible)
J02906	cytochrome P450, subfamily IIF, polypeptide 1
J02871	cytochrome P450, subfamily IVB, polypeptide 1
Z00036	cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible),

	polypeptide 2
D00632	glutathione peroxidase 3 (plasma)
L19185	peroxiredoxin 2
X67951	peroxiredoxin 1
X15722	glutathione reductase
J03746	microsomal glutathione S-transferase 1
X15480	glutathione S-transferase pi
Y00433	glutathione peroxidase 1
X79389	glutathione S-transferase theta 1
X97261	methallothionein 1H (MT1H); metallothionein 0 (MT0) + MT1I; MT2 + MT1L + MT1R
X53463	glutathione peroxidase-gastrointestinal (GSHPX-GI); glutathione peroxidase-related protein 2 (GPRP)
X06985	heme oxygenase (decycling) 1
D21243	heme oxygenase (decycling) 2
M64082	flavin containing monooxygenase 1
X08020	glutathione S-transferase M4
M25627	glutathione S-transferase A2
U90313	glutathione-S-transferase like; glutathione transferase omega
U34683	glutathione synthetase
J03934	diaphorase (NADH/NADPH) (cytochrome b-5 reductase)
M60974	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
S40706	DNA-damage-inducible transcript 3
M14565	cytochrome P450, subfamily XIA (cholesterol side chain cleavage)
Y10387	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1 (PAPS synthase 1; PAPSS1); PAPS synthetase 1; sulfurylase kinase 1 (SK1)
M23698	serum amyloid A1
Z11737	flavin containing monooxygenase 4
U07550	heat shock 10kD protein 1 (chaperonin 10)
U15590	heat shock 27kD protein 3
M16660	heat shock 90kD protein 1, beta
J04093	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6
J05459	glutathione S-transferase M3 (brain)

K03191	cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), polypeptide 1
L07765	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)
L48516	paraoxonase 3
M12792	cytochrome P450, subfamily XXIA (steroid 21-hydroxylase, congenital adrenal hyperplasia), polypeptide 2
M20403	cytochrome P450, subfamily IID (debrisoquine, sparteine, etc., metabolizing), polypeptide 6
M57899	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1
M57951	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B
M69177	monoamine oxidase B
M84127	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A3
S55985	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-2 (UDPGT; UGT1.2; UGT1B; GNT1); HLUGP4
S62904	thiopurine S-methyltransferase
U12778	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain
X55764	cytochrome P450, subfamily XIB (steroid 11-beta-hydroxylase), polypeptide 1
X71480	cytochrome P450 IVA11 (CYP4A11)
Y09501	diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase)
D86956	heat shock 105kD
J02947	superoxide dismutase 3, extracellular
D13388	heat shock protein, DNAJ-like 2
L05628	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
L12723	heat shock 70kD protein 4
L15189	heat shock 70kD protein 9B (mortalin-2)
M86752	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)
S45630	crystallin, alpha B
S67070	heat shock 27kD protein 2
U05569	crystallin, alpha A
U08021	nicotinamide N-methyltransferase
U09031	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
D16581	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1

U65785	oxygen regulated protein (150kD)
X04076	catalase
X07834	superoxide dismutase 2, mitochondrial
X15187	tumor rejection antigen (gp96) 1
X52882	t-complex 1
L37080	flavin containing monooxygenase 5
M23234	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
U40992	DnaJ-like heat shock protein 40
M26880	ubiquitin C

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Bestimmung von reversiblen oder irreversiblen physiologischen Nebenwirkungen einer Substanz, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
  - a) Bereitstellen einer mit der Substanz behandelten Probe, vorzugsweise bestehend aus einer Zelle oder mehreren Zellen in einem Zellverband oder einem Organ,
  - b) Bestimmen zellulärer und/oder subzellulärer Muster aus örtlicher Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, insbesondere Proteine, RNA-Moleküle oder DNA-Segmente, in mindestens einer Subpopulation von Zellen,
  - c) Vergleichen der im Schritt b) erhaltenen Muster mit Mustern einer unbehandelten Kontrollprobe,
  - d) Ermitteln einer physiologischen Nebenwirkung der Substanz anhand unterschiedlicher Muster für eine behandelte Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1 zur Bestimmung von zellassozierten Lokalisations- und Co-Lokalisations- und Konzentrationsmustern von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, wobei mindestens eine Subpopulation von lebenden Zellen mit mindestens einer physiologisch wirksamen Substanz zu mindestens einem Zeitpunkt vorbehandelt wird und die anschließende Bestimmung entweder an lebenden oder fixierten Zellen durchgeführt wird.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der zellulären Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration mit einer örtlichen Auflösung von kleiner 20µm, vorzugsweise kleiner 10µm, vorzugsweise kleiner 2µm betrieben wird.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß physiologische Nebenwirkungen als reversible

Nebenwirkungen oder irreversible toxische Effekte organspezifisch oder zellspezifisch quantifizierend oder digitalisierend bestimmt werden.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die quantifizierende oder digitalisierende Bestimmung auf statistischen Resultaten basiert, die auf Einzelzelebene erhalten werden.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei ein charakteristisches zelluläres Molekülmuster dadurch gebildet wird, daß mindestens 2 definierte Moleküle individuell mit optischer Auflösung eines Meßvolumenelementes von der Dimension einer Zelle oder einem optisch aufgelösten Meßvolumenelement als Teilvolumenelement einer Zelle der Zahl 0 oder 1 zugeordnet werden, je nachdem ob die jeweilige Konzentration über oder unter einem zuvor bestimmten Schwellwert liegt, oder wobei mindestens ein charakteristisches subzelluläres Molekülmuster aus Molekülmustern der einzelnen subzellulären Teilvolumenelemente einer Zelle oder eines Zelltyps gebildet wird.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die örtliche Auflösung zur Bestimmung der zellulären Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration in eine zeitliche Auflösung transformiert wird.
8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung der Lokalisation und Co-Lokalisation mathematische Transformationen des gemessenen Signals verwendet werden, insbesondere Kreuzkorrelation und/oder Fouriertransformationen und/oder Laplacetransformationen und/oder Wavelet-Transformationen mit variablen Argumenten.
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß neben der Erfassung der Toxizitätswirkungs- oder Nebenwirkungs-spezifischen Muster auch Indikatoren zur Bestimmung des zellulären Subtyps des orts aufgelösten Meßelementes erfaßt werden.



10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die subzellulären Muster durch mindestens zwei optisch unterscheidbare Marker-markierte Antikörper oder optisch unterscheidbare Marker-markierte Bindemoleküle oder Gruppen solcher Bindemoleküle generiert werden, indem die jeweils spezifischen Antikörper oder Bindemoleküle mit der fixierten Probe, enthaltend mindestens eine Zelle, Zellverband, Organ oder Organismus, zur Reaktion gebracht werden und die topologische oder zeitliche Verteilung der optisch unterscheidbaren Signale registriert wird.

11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die subzellulären Muster durch optisch unterscheidbare Marker-markierte Antikörper oder optisch unterscheidbare Marker-markierte Bindemoleküle oder Gruppen solcher Bindemoleküle generiert werden, indem im zyklischen Ablauf sequentiell die jeweils spezifischen Antikörper oder Bindemoleküle mit der fixierten Probe, enthaltend mindestens eine Zelle, Zellverband, Organ oder Organismus, zur Reaktion gebracht werden, die Topologie und Intensität der optischen Signale registriert werden, bevor nach einem Ausbleichschritt der gebundenen optischen Marker zu Beginn des Folgezyklus der nächste Antikörper oder das nächste Bindemolekül zur Reaktion gebracht wird und wobei mindestens zwei Zyklen durchlaufen werden.

12. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 10 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die optisch unterscheidbaren Marker fluoreszierende Marker sind.

13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß optisch unterscheidbare Signale über unterschiedliche Excitationswellenlängen, unterschiedliche Emissionswellenlängen, unterschiedliche Lebenszeiten der angeregten Zustände, unterschiedliche Intensitäten, unterschiedliche Energietransfereffizienzen oder unterschiedliche Polarisationsseigenschaften oder definierte Kombinationen davon gemessen werden.

14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die subzellulären Muster durch optische Marker von in situ markierten Molekülen generiert werden, indem mindestens zwei Molekültypen als Surrogatmarker fungieren, die optisch unterscheidbare Marker tragen.

15. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß Wirkung, Nebenwirkung oder Toxizität von Wirksubstanzen über veränderte morphologische Muster von Zellen oder Zellorganellen identifiziert werden.

16. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen embryonale oder adulte Stammzellen sind oder davon abgeleitete funktional differenzierte Zelltypen.

17. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung genotypischer Nebenwirkungen oder Toxizitätseffekte Zelle, Zellverband, Organ oder Organismus unterschiedliche Genotypen und damit assoziierte Phänotypen repräsentieren.

-1/4-

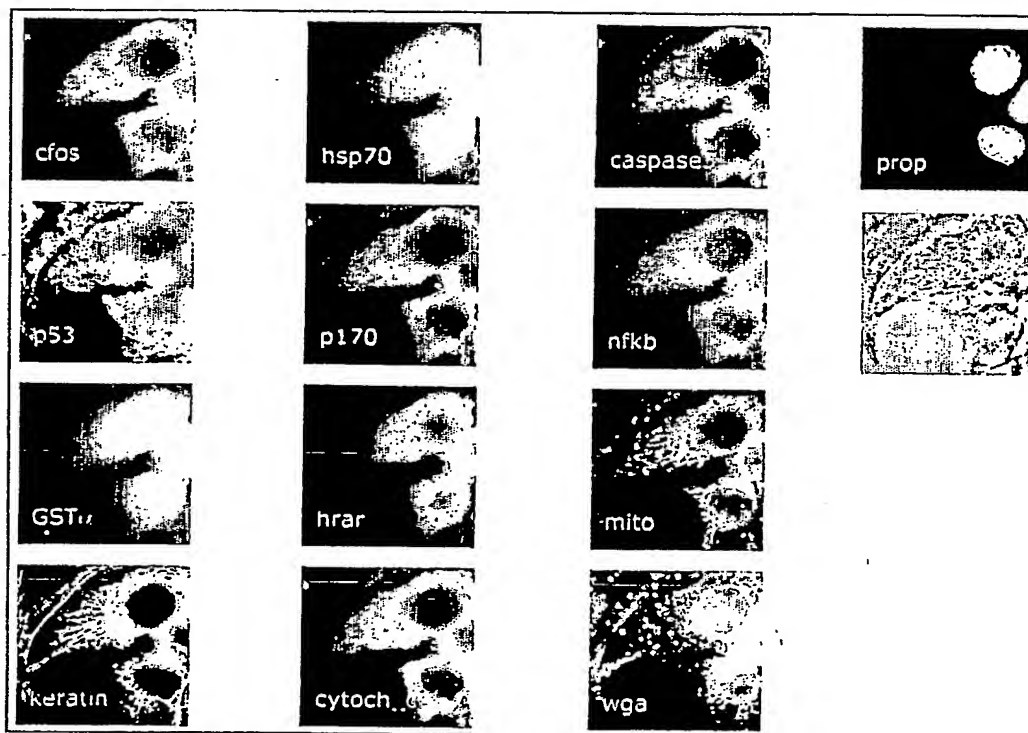


Fig.1

-2/4-

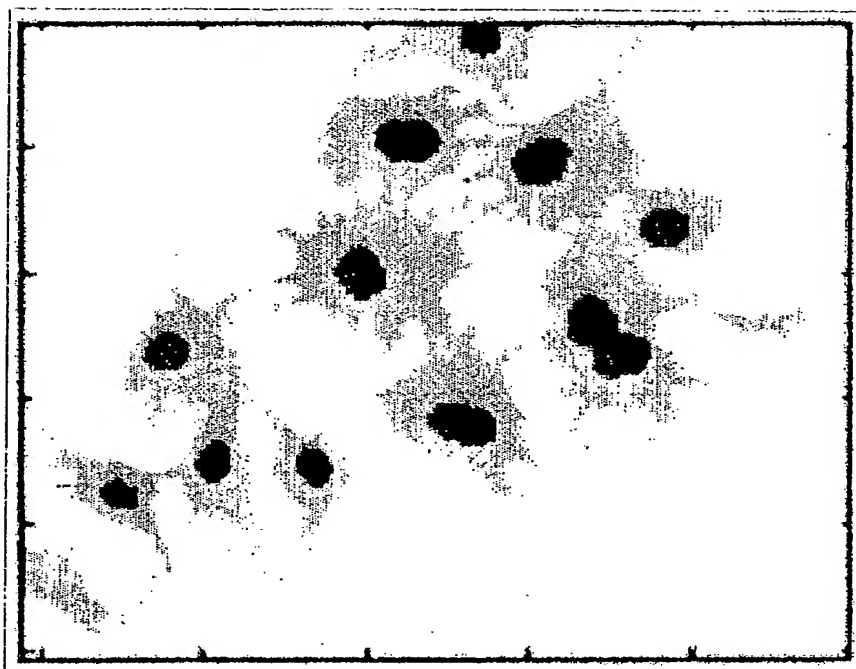
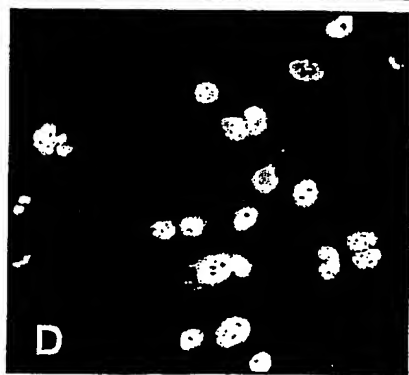
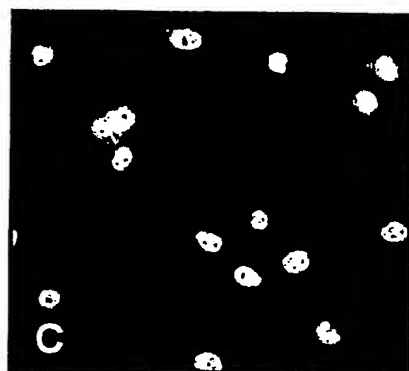
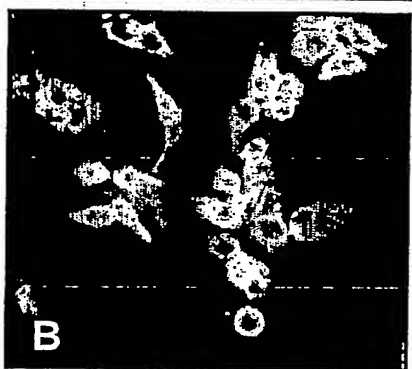


Fig.2

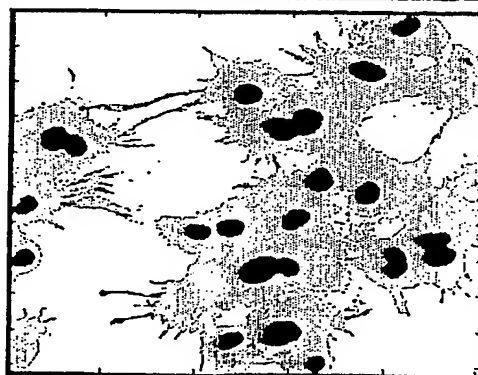
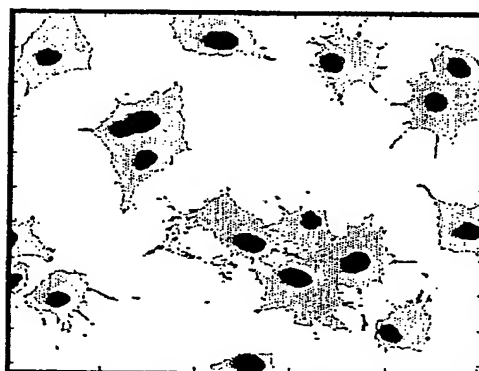
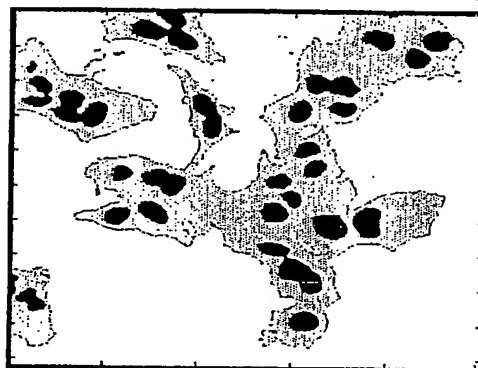
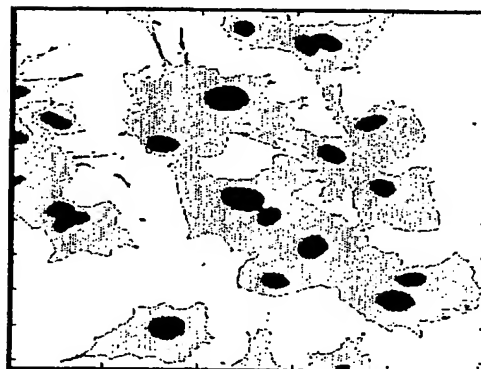
Fig.3

-3/4-

Verteilung von hRAR

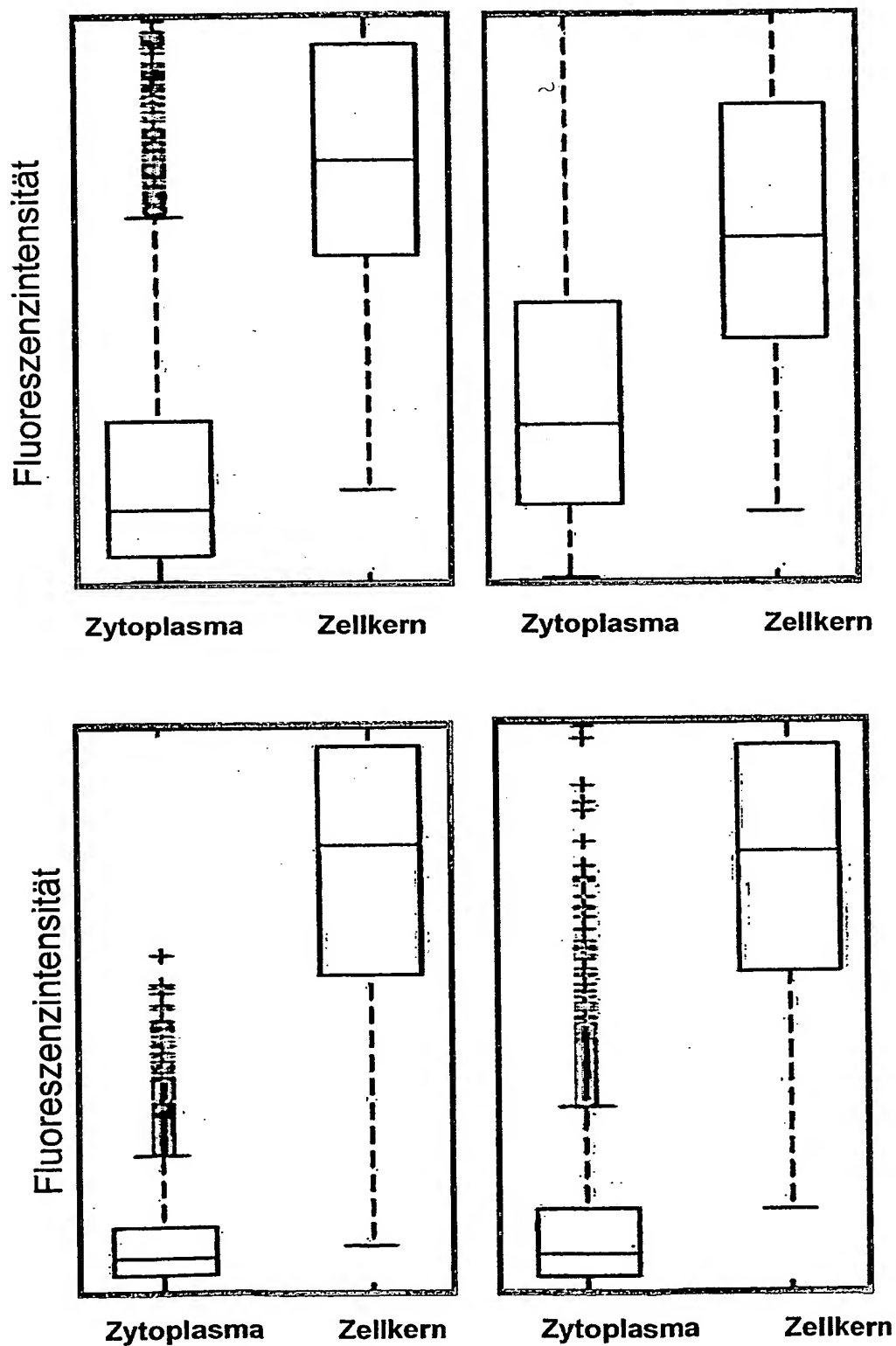


Definierte Bereiche



-4/4-

Fig.4



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
19. Juni 2003 (19.06.2003)

PCT

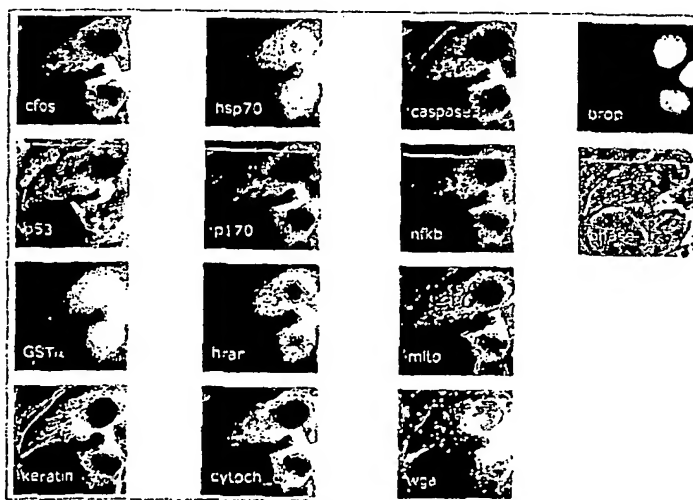
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/050535 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/50, C12Q 1/02
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13996
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
10. Dezember 2002 (10.12.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 60 413.0 10. Dezember 2001 (10.12.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC OAI AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE). EVOTEC TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Max-Planck-Str. 15a, 40699 Brkrath (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HENCO, Karsten [DE/DE]; Tiefenberg 27, 40629 Düsseldorf (DE). JESSEN, Timm [DE/DE]; Bückeweg 1, 24357 Fleckeby (DE). KUPPER, Jürgen [DE/DE]; Burbekstr. 47, 22523 Hamburg (DE). GREINER, Erich [DE/DE]; Brückenstr. 34, 69120 Heidelberg (DE). GÜNTHER, Rolf [DE/DE]; Simon-von-Utrecht-Str. 65, 20359 Hamburg (DE).
- (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE INFLUENCE OF NON-PHYSIOLOGICAL COMPOUNDS THE DERIVATIVES AND DECOMPOSITION PRODUCTS THEREOF ON ORGANISMS ORGANS AND CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON EINFLÜSSEN UNPHYSIOLOGISCHER VERBINDUNGEN, DEREN DERIVATE UND ABBAUPRODUKTE AUF ORGANISMEN, ORGANE UND ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for determining reversible or irreversible physiological side-effects of a substance whereby said method comprises the following steps: a) preparation of a sample treated with the substance, preferably comprising a single cell or several cells in a cell structure or an organ, b) determination of cellular and/or sub-cellular patterns from regional localisations and co-localisations of at least two different molecules, in particular proteins, RNA molecules, or DNA segments, in at least one sub-population of cells, c) comparison of the pattern obtained in step b) with patterns from an untreated control sample and d) determination of a physiological side-effect of the substance by means of various patterns for a treated sample in comparison with an untreated sample.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/050535 A3



SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

- (88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

18. Dezember 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren zur Bestimmung von reversiblen oder irreversiblen physiologischen Nebenwirkungen einer Substanz, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt: a) Bereitstellen einer mit der Substanz behandelten Probe, vorzugsweise bestehend aus einer Zelle oder mehreren Zellen in einem Zellverband oder einem Organ, b) Bestimmen zellulärer und/oder subzellulärer Muster aus örtlicher Lokalisation und Co-Lokalisation und Konzentration von mindestens zwei verschiedenen Molekülen, insbesondere Proteine, RNA-Moleküle oder DNA-Segmente, in mindestens einer Subpopulation von Zellen, c) Vergleichen der im Schritt b) erhaltenen Muster mit Mustern einer unbehandelten Kontrollprobe, d) Ermitteln einer physiologischen Nebenwirkung der Substanz anhand unterschiedlicher Muster für eine behandelte Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationa Application No

PCT/EP 02/13996

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/50 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 77517 A (TRELLIS BIOINFORMATICS INC) 21 December 2000 (2000-12-21)	1-10, 12-16
Y	the whole document	11,17
X	WO 98 45704 A (TULLIN SOEREN ;KASPER ALMHOLT (DK); NOVONORDISK AS (DK); SCUDDER K) 15 October 1998 (1998-10-15) claim 21; figure 10; example 1 page 22	1-5,7
Y	US 6 150 173 A (SCHUBERT WALTER) 21 November 2000 (2000-11-21) cited in the application the whole document	11,17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date, but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 October 2003

Date of mailing of the international search report

22/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schalich, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP 02/13996

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0077517	A	21-12-2000	AU 5488000 A	02-01-2001
			CA 2375155 A1	21-12-2000
			EP 1185864 A1	13-03-2002
			JP 2003502642 T	21-01-2003
			WO 0077517 A1	21-12-2000
WO 9845704	A	15-10-1998	AT 215227 T	15-04-2002
			AU 6820998 A	30-10-1998
			DE 69804446 D1	02-05-2002
			DE 69804446 T2	07-11-2002
			WO 9845704 A2	15-10-1998
			DK 986753 T3	22-07-2002
			EP 1199564 A2	24-04-2002
			EP 0986753 A2	22-03-2000
			ES 2173573 T3	16-10-2002
			JP 2001522454 T	13-11-2001
			PT 986753 T	30-09-2002
			US 2003082564 A1	01-05-2003
			US 6518021 B1	11-02-2003
US 6150173	A	21-11-2000	DE 19709348 A1	04-12-1997
			EP 0810428 A2	03-12-1997
			JP 10123027 A	15-05-1998

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal

Iktenzeichen

PCT/EP 02/13996

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/50 C12Q1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 77517 A (TRELLIS BIOINFORMATICS INC) 21. Dezember 2000 (2000-12-21)	1-10, 12-16
Y	das ganze Dokument	11, 17
X	WO 98 45704 A (TULLIN SOEREN ; KASPER ALMHOLT (DK); NOVONORDISK AS (DK); SCUDDER K) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Anspruch 21; Abbildung 10; Beispiel 1 Seite 22	1-5, 7
Y	US 6 150 173 A (SCHUBERT WALTER) 21. November 2000 (2000-11-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	11, 17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Oktober 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/10/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schalich, J

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internati-      kenzeichen  
PCT/EP 02/13996

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0077517	A	21-12-2000	AU 5488000 A 02-01-2001
		CA 2375155 A1 21-12-2000	
		EP 1185864 A1 13-03-2002	
		JP 2003502642 T 21-01-2003	
		WO 0077517 A1 21-12-2000	
WO 9845704	A	15-10-1998	AT 215227 T 15-04-2002
		AU 6820998 A 30-10-1998	
		DE 69804446 D1 02-05-2002	
		DE 69804446 T2 07-11-2002	
		WO 9845704 A2 15-10-1998	
		DK 986753 T3 22-07-2002	
		EP 1199564 A2 24-04-2002	
		EP 0986753 A2 22-03-2000	
		ES 2173573 T3 16-10-2002	
		JP 2001522454 T 13-11-2001	
		PT 986753 T 30-09-2002	
		US 2003082564 A1 01-05-2003	
		US 6518021 B1 11-02-2003	
US 6150173	A	21-11-2000	DE 19709348 A1 04-12-1997
		EP 0810428 A2 03-12-1997	
		JP 10123027 A 15-05-1998	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**